

HALAMAN PENGESAHAN

Azotobacter SEBAGAI BIOAKUMULATOR MERKURI

TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat
Memperoleh Gelar Sarjana Sains
pada
Jurusan S-1 Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :

KUSNUL KHOTIMAH
NRP. 1510 100 043

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

Dr. Enny Zulaika, M.P. (Pembimbing)

Surabaya, 25 Juli 2014

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi



Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si
NIP. 19690907 199803 2 001

Azotobacter SEBAGAI BIOAKUMULATOR MERKURI

Nama : Kusnul Khotimah
NRP : 1510 100 043
Jurusan : Biologi
Dosen Pembimbing : Dr. Enny Zulaika, MP.

Abstrak

Merkuri merupakan logam berat paling toksik dibandingkan dengan logam berat lainnya. Beberapa bakteri ada yang resisten merkuri. Salah satu genus bakteri resisten merkuri dan mampu mengakumulasi merkuri yaitu Azotobacter. Azotobacter merupakan bakteri pemfiksasi nitrogen bebas non simbiotik yang melimpah di daerah rhizosfer lahan pertanian dan merupakan bakteri penghasil EPS yang dapat berfungsi sebagai pengkheletat logam.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat Azotobacter yang resisten terhadap merkuri $HgCl_2$, dan mengukur kemampuan bioakumulasinya terhadap $HgCl_2$. Isolasi bakteri Azotobacter dilakukan dengan media selektif Azotobacter. uji resistensi $HgCl_2$ dilakukan dengan streak agar miring dan kemampuan bioakumulasi diukur dengan metode serapan atom serta uji viabilitas menggunakan metode pour plate. Analisis beda nyata dengan ANOVA pada taraf 5% dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT).

Tiga isolat Azotobacter dari lahan eco urban farming ITS resisten terhadap $HgCl_2$ sampai 20 mg/L yaitu A5, A6, dan A9. Efisiensi bioakumulasi yang tertinggi pada pemaparan $HgCl_2$ 5 mg/L yaitu isolat A5 (89%) dan A9 (87%).

Kata kunci : Azotobacter, bioakumulator, merkuri, uji resistensi.

Azotobacter AS A MERCURY BIOACCUMULATOR

Student Name : Kusnul Khotimah
NRP : 1510 100 043
Department : Biology
Supervisor : Dr. Enny Zulaika, MP.

Abstract

Mercury is the most toxic heavy metals compared with other heavy metals. Some bacteria are resistant to mercury. One of mercury resistant bacteria genus and able to accumulate of mercury is *Azotobacter*. *Azotobacter* is free-living nitrogen fixing bacteria which abundant in rhizosphere area of agricultural land and it is EPS producing bacteria that can serve as chelating metals.

This research aims to get *Azotobacter* isolates resistant to mercury HgCl_2 , and measure the ability of mercury bioaccumulation. Isolation of *Azotobacter* by selective *Azotobacter* media, resistance test by streak at slant agar, and bioaccumulation ability measured by atomic absorption method and viability test using *pour plate* method. Observed data analyzed by ANOVA, continued by Least Significant Difference (LSD) test, Both test at level 5 %.

Three *Azotobacter* isolates from eco urban farming ITS land are resistant until 20 mg/L of HgCl_2 which is A5, A6 and A9. The highest efficiency bioaccumulation on exposure 5 mg/L HgCl_2 is A5 (89%) and A9 (87%).

Keywords : *Azotobacter*, bioaccumulator, mercury, resistance test.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Merkuri

Logam merkuri atau air raksa mempunyai nama kimia *hydragyrum* yang berarti perak cair. Logam merkuri dilambangkan dengan Hg. Merkuri merupakan salah satu unsur logam transisi dengan golongan IIB dan memiliki nomor atom (NA=80) dan massa molekul relatif (MR= 200,59). Merkuri merupakan satu-satunya logam yang berbentuk cair pada suhu kamar (25⁰ C) dan mempunyai titik beku terendah dari semua logam yaitu -39⁰ C, mudah bercampur dengan logam-logam lain menjadi logam campuran (amalgam/alloy). Merkuri merupakan logam yang paling mudah menguap jika dibandingkan dengan logam-logam yang lain, juga dapat digunakan sebagai konduktor arus listrik (Alfian, 2006).

Merkuri merupakan logam yang sangat toksik terhadap organisme, dalam penggunaan atau aktivitas tertentu merkuri akan disebarkan ke lingkungan baik berupa limbah bahan pertanian, obat-obatan, cat, kertas, pertambangan serta sisa buangan industri. Semua bentuk merkuri baik dalam bentuk unsur, gas, maupun dalam bentuk garam-garam merkuri adalah beracun (Alfian, 2006).

Menurut Inswiasri (2008), pada prinsipnya, merkuri dapat dibagi menjadi 3 bentuk utama yaitu

1. Bentuk murni

Merkuri metal (elemental merkuri) merupakan logam berwarna putih, pada suhu kamar berada berbentuk cair dan membentuk uap jika suhu semakin meningkat.

2. Merkuri berbentuk senyawa anorganik

Senyawa merkuri anorganik terbentuk ketika merkuri dikombinasikan dengan elemen lain seperti klorin (Cl), sulfur atau oksigen dalam bentuk garam merkuri. Senyawa merkuri anorganik seperti HgCl₂ berbentuk bubuk putih atau kristal, kecuali merkuri sulfida (HgS) berwarna merah.

3. Merkuri berbentuk senyawa organik

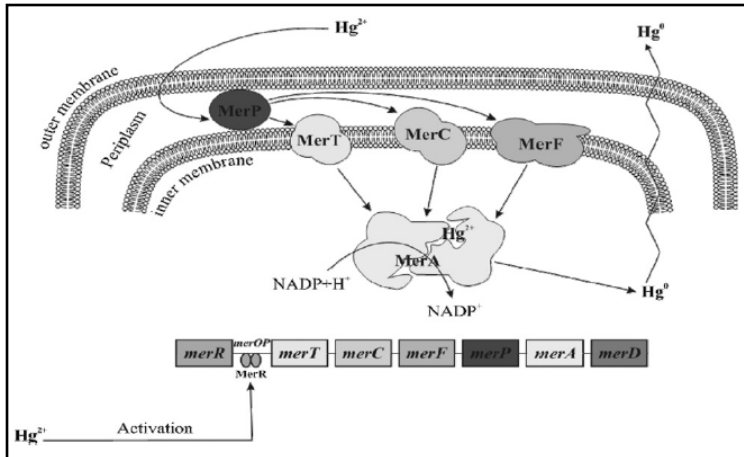
Senyawa merkuri organik terjadi ketika merkuri bertemu dengan karbon membentuk organomerkuri atau metilmerkuri. Senyawa merkuri organik pada hewan dan manusia diabsorpsi melalui jalur pencernaan, pernapasan, dan kulit, hampir 90 % diabsorpsi melalui jalur pencernaan. Selama di dalam tubuh, logam berat merkuri akan terikat pada struktur molekul protein, metalotionin-sistein dan hemoglobin. Keracunan merkuri dapat mengganggu fungsi ginjal dan dapat mengganggu sistem saraf pusat maupun sistem saraf tepi.

2.2 Bakteri Resisten Merkuri

Merkuri merupakan logam yang paling beracun, namun beberapa bakteri memiliki mekanisme resistensi terhadap merkuri dan memainkan peran utama dalam siklus merkuri di alam (Osborn *et al.*, 1997). Berbagai macam bakteri Gram-positif dan Gram-negatif memiliki mekanisme resistensi yang unik terhadap logam berat merkuri dan mengubah bentuk merkuri yang beracun menjadi bentuk yang tidak beracun. Populasi bakteri resisten merkuri berbanding lurus dengan tingkat kontaminasi merkuri yang ada di lingkungan (Dash & Das, 2012).

Bakteri resisten merkuri dapat bersifat aerob atau anaerob fakultatif dan dapat diisolasi dari berbagai media seperti air, tanah, sediman, bahkan dari manusia atau hewan. Beberapa anggota genera bakteri seperti *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bacteriodes*, *Beijerinckia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Exiguobacterium*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Morganella*, *Mycobacterium*, *Paracoccus*, *Proteus*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shewanella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Thiobacillus*, *Xanthomonas* dan *Yersinia* merupakan bakteri resisten merkuri (Barkay *et al.*, 2003).

Resistensi bakteri terhadap merkuri karena pada bakteri resisten merkuri memiliki gen resisten merkuri yang disebut gen *mer operon*. Umumnya struktur *mer operon* terdiri dari gen metaloregulator (*merR*), gen transport merkuri (*merT*, *merP*, *merC*, *merF*), gen merkuri reduktase (*merA*) dan organomerkuri liase (*merB*) (Nascimento & Souza, 2003). Gen *merA* mengkode merkuri reduktase yang berfungsi untuk mereduksi Hg^{2+} menjadi Hg^0 volatil dan *merB* mengkode organomerkuri liase yang berfungsi untuk memutus ikatan C-Hg. Mekanisme dalam *mer operon* ini adalah Hg^{2+} masuk ke dalam periplasma terikat ke residu sistein *merP* yang kemudian ditransfer ke residu sistein *merT* atau *merC* atau *merF*. Setelah masuk ke dalam sel, ion merkuri menyeberang membran sitoplasma melalui proses pertukaran ligan menuju sisi aktif merkuri reduktase (*merA*) dimana Hg^{2+} direduksi menjadi Hg^0 volatil yang selanjutnya dikeluarkan dari sel (Dash & Das, 2012). Skema *mer operon* bakteri resisten merkuri dapat dilihat pada gambar 2.1.



Gambar 2.1. Skema *mer operon* Bakteri Resistan Merkuri (Dash & Das, 2012).

Bakteri resisten merkuri dibagi menjadi 2 tipe yaitu (1) bakteri resisten merkuri spektrum sempit adalah bakteri yang hanya resisten terhadap merkuri anorganik dan (2) bakteri resisten merkuri spektrum luas adalah bakteri yang resisten terhadap merkuri anorganik dan merkuri organik (Dash & Das, 2012).

2.3 Bioakumulasi

Beberapa jenis bakteri diketahui memiliki kemampuan menyerap, mereduksi dan mengakumulasi logam berat. Akumulasi logam dari mediumnya merupakan perbandingan kandungan logam dalam biota terhadap kandungan logam dalam mediumnya (Haryoto & Wibowo, 2004).

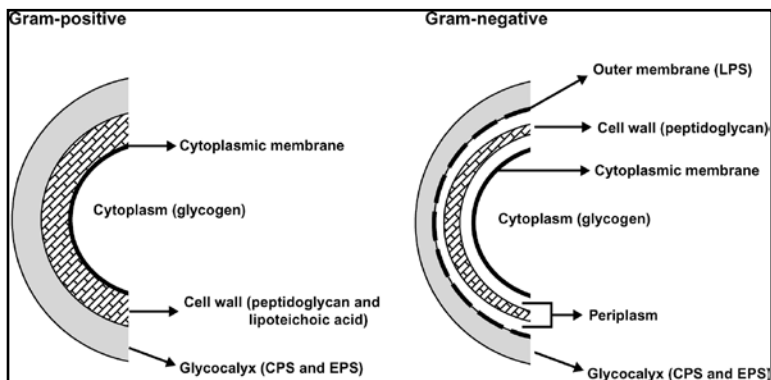
Bakteri yang mempunyai habitat tercemar logam berat dan resistensi terhadap logam berat mempunyai mekanisme biosorpsi dan atau bioakumulasi terhadap logam berat tersebut (Zulaika *et al.*, 2012). Umumnya proses biosorpsi adalah proses pasif yaitu proses pengikatan melalui pertukaran ion logam atau polutan dengan gugus fungsional pada dinding atau permukaan sel seperti gugus karboksil, sulfonat, fosforil, amino, dan imidazol (Chojnacka, 2010).

Faktor-faktor yang mempengaruhi proses biosorpsi meliputi jenis biomassa (komposisi dinding sel), pH, suhu, kehadiran ion pesaing lainnya (baik kation atau anion). Umumnya, kenaikan pH menyebabkan deprotonasi pada ion logam dan penurunan pH menyebabkan kompetisi antara proton dan ion logam (Chojnacka, 2010).

Menurut Chojnacka (2010), bioakumulasi didefinisikan sebagai akumulasi logam atau polutan secara intraseluler oleh biosorben yang terjadi dalam dua tahap yaitu (1) proses cepat atau biosorpsi dan (2) proses lambat atau bioakumulasi, termasuk pengangkutan logam atau polutan ke dalam sel melalui sistem transport aktif. Proses bioakumulasi lebih kompleks dibandingkan dengan biosorpsi karena proses bioakumulasi membutuhkan aktivitas metabolisme sel. Faktor-faktor yang mempengaruhi proses bioakumulasi antara lain komposisi medium pertumbuhan

pH, suhu, adanya polutan lain, dan surfaktan. Disisi lain, proses bioakumulasi juga didukung oleh sintesis protein yang disebut metalotionein yang kaya akan gugus thiol. Gugus thiol akan mengikat logam atau polutan dan menjadikannya dalam bentuk tidak aktif secara biologis. Protein metalotionein disintesis sebagai respon terhadap keberadaan logam dalam lingkungan atau medium pertumbuhannya. Proses bioakumulasi akan lebih optimal jika digunakan spesies bakteri yang diisolasi dari lingkungan yang tercemar.

Menurut Primaharinastiti *et al* (2004), mekanisme akumulasi logam dapat terjadi pada komponen ekstraseluler, pada permukaan sel, dan pada intraseluler. Pada ekstraseluler, akumulasi logam dapat disebabkan oleh adanya pembentukan polimer ekstraseluler membentuk kompleks dengan logam. Akumulasi pada permukaan sel merupakan hasil reaksi kompleks antara ion logam dan konstituen dinding sel. Skema dinding sel dan membran sel bakteri dapat dilihat pada Gambar 2.2, sedangkan proses akumulasi intrasel memerlukan sistem transport aktif yang sangat spesifik untuk masuknya logam ion pada suatu sel.

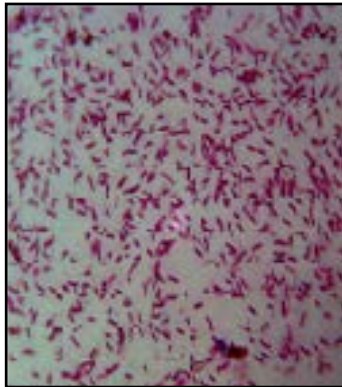


Gambar 2.2. Membran Sel Bakteri Gram-negatif dan Gram-positif (Ruas-Madiedo & Reyes-Gavilan, 2005).

2.4 Genus *Azotobacter*

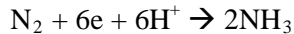
Azotobacter merupakan bakteri gram negatif yang memiliki ciri-ciri : sel dengan diameter $\geq 2.0 \mu\text{m}$, pleumorfik, berbentuk batang hingga bulat, tunggal, (Gambar 2.3) berkoloni tidak beraturan, dan kadang-kadang membentuk rantai dengan panjang bervariasi, memiliki kista dengan dinding yang tebal, tidak menghasilkan endospora, motil dengan flagela peritrik atau non motil. Beberapa spesies dari genus *Azotobacter* menghasilkan pigmen sehingga dapat larut dalam air yang tampak berwarna hijau di bawah sinar ultraviolet. *Azotobacter* mampu tumbuh pada bermacam-macam media yang mengandung sumber karbon dari karbohidrat, alkohol atau asam organik. Bersifat aerob tetapi juga mampu tumbuh pada kondisi sedikit oksigen. Suhu optimum pertumbuhannya antara 20°C - 30°C , kisaran pH untuk pertumbuhannya 5,5 - 8,5 dan pH optimum 7-7,5 (Buchanan & Gibbons, 1974).

Genus *Azotobacter* termasuk dalam subclass proteobacteria yang terdiri dari tujuh spesies antara lain : *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii*, *A. paspali*, *A. armeniacus*, *A. nigricans* dan *A. salinestri*. *Azotobacter* dapat ditemukan dalam tanah, air dan sedimen (Jimenez *et al.*, 2011).



Gambar 2.3. *Azotobacter* sp. (Jimenez *et al.*, 2011).

Anggota genus *Azotobacter* adalah bakteri pemfiksasi nitrogen non simbiotik, mampu memfiksasi 10 mg nitrogen per gram sumber karbon yang digunakan. Fiksasi nitrogen dikatalisis oleh enzim nitrogenase yang mereduksi N_2 menjadi amonia (NH_3) (Patel *et al.*, 2013). Kemampuan memfiksasi nitrogen bebas dikendalikan oleh gen *nif*, reaksi kimia reduksi N_2 menjadi amonia (NH_3) adalah :



(Ristiati & Muliadihardja, 2008).

Anggota genus *Azotobacter* banyak digunakan sebagai pupuk hayati dalam bidang agrikultur (Rajeswari & Kasthuri, 2009) karena memiliki kemampuan mensintesis antibiotik, hormon pertumbuhan tanaman, vitamin, dan dapat melarutkan fosfat (Jimenez *et al.*, 2011). Beberapa anggota *Azotobacter* merupakan bakteri resisten merkuri sehingga mampu mereduksi merkuri dari lingkungan hidupnya (Ray *et al.*, 1989). *Azotobacter* sp. dikenal sebagai penghasil polisakarida ekstraseluler (EPS) seperti alginat dan polimer. Polisakarida ekstraseluler ini berfungsi untuk melindungi sel dan metabolisme nitrogenase sehingga meningkatkan fiksasi nitrogen dan untuk mengabsorpsi logam (Widiastuti, 2010). Menurut Penelitian Ghosh *et al* (1999), *Azotobacter* merupakan bakteri resisten merkuri spektrum luas yang selain mampu memvolatilisasi merkuri juga resisten terhadap merkuri organik.

Semua anggota dari genus *Azotobacter* memiliki ciri koloni yang berair (slimy), berkilau (glistening), berwarna keputi-putihan, memiliki elevasi convex, dan diameter koloni berkisar 2-10 mm (Aquilanti *et al.*, 2004). Menurut Gomare *et al* (2013), koloni *Azotobacter* memiliki karakteristik berukuran besar, flat, berwarna putih susu, seperti berlendir dan berair.

Berdasarkan penelitian Ray *et al.* (1989), *Azotobacter* yang telah diisolasi dari tanah pertanian, mampu resisten sampai dengan konsentrasi 100 nmol $HgCl_2$ dan mampu mereduksi 2,6 mg $HgCl_2$ dalam 200 ml media *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung $HgCl_2$ 3,3 mg. Selain itu, berdasarkan penelitian

Ghosh *et al.* (1997), *Azotobacter* yang telah diisolasi dari tanah perkebunan Bengal dan Bihar Timur, India, mampu memvolatilisasi HgCl_2 hingga 80 % dari 200 ml media *Nutrient Broth* (NB) yang mengandung 3,3 mg HgCl_2 .

BAB III METODOLOGI

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Januari – Juni 2014 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA-ITS. Analisis bioakumulasi logam merkuri dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Konsultasi Industri Surabaya.

3.2 Alat, Bahan dan Cara Kerja

3.2.1 Isolasi *Azotobacter*

Sampel tanah diambil dari lahan *eco urban farming* ITS secara komposit, ditimbang 10 gram sampel tanah, dimasukkan ke dalam 90 ml akuades steril. Dilakukan pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-7} (Saraswati *et al.*, 2007). Masing-masing pengenceran, diambil sebanyak 0,1 ml (Saraswati *et al.*, 2007), ditumbuhkan pada media selektif *Azotobacter* agar yang mengandung 0,1 mg/L HgCl_2 dengan metode *spread plate*. (Harley & Prescott, 2002). Inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 24 jam. Koloni yang tumbuh diamati karakteristiknya dan dibandingkan dengan kontrol positif yaitu *Azotobacter chroococcum*. Koloni *Azotobacter chroococcum* mempunyai ciri putih basah dan berubah menjadi coklat setelah 3-5 hari inkubasi (Saraswati *et al.*, 2007).

Koloni yang diduga *Azotobacter chroococcum* dimurnikan dengan metode 16 goresan pada media *Nutrient Agar*. Selanjutnya dilakukan pengamatan kemurnian sel dengan metode pewarnaan methylen blue dan untuk memastikan bahwa isolat tersebut *Azotobacter*, dilakukan pewarnaan Gram dan pewarnaan kista.

3.2.2 Uji resistensi terhadap HgCl_2

Uji resistensi dilakukan dengan menumbuhkan isolat *Azotobacter* yang didapat dari hasil isolasi pada media selektif *Azotobacter* slant agar (Zulaika *et al.*, 2013), yang mengandung HgCl_2 berbagai konsentrasi mulai dari konsentrasi 0.5 mg/L dan

seterusnya sampai konsentrasi yang mampu ditoleransi isolat *Azotobacter*. Inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu ruang, koloni yang tumbuh merupakan isolat yang resisten terhadap HgCl_2 . Isolat yang digunakan adalah isolat yang mempunyai resisten tinggi terhadap HgCl_2 .

3.2.3 Pembuatan kurva pertumbuhan isolat *Azotobacter*

Satu ose isolat *Azotobacter* berumur 24 jam dari media padat NA- HgCl_2 0,1 mg/L diinokulasikan ke dalam 40 ml media cair $\frac{1}{2}$ *Nutrient Broth* (NB) dalam Erlenmeyer kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang di atas *Rotary Shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Setelah 24 jam, sebanyak 40 ml kultur sel diinokulasikan ke dalam 160 ml media $\frac{1}{2}$ NB- HgCl_2 0,1 mg/L (Harley & Prescott, 2002), diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang di atas *Rotary Shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Setiap jam diambil sebanyak 2 mL kultur dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur nilai *Optical Density* (OD) nya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 600 nm (Harley & Prescott, 2002). Pengukuran *Optical Density* (OD) dimulai dari jam ke-0 sampai jam ke-24. Data *Optical Density* (OD) yang didapatkan kemudian dibuat kurva pertumbuhan dengan sumbu x sebagai waktu (t) dan sumbu y sebagai hasil *Optical Density* (OD). Berdasarkan kurva pertumbuhan, umur kultur untuk perlakuan (μ) yang digunakan adalah pada rata-rata waktu fase eksponensial.

3.2.4 Uji bioakumulasi Hg

Konsentrasi HgCl_2 yang digunakan adalah konsentrasi yang mampu ditoleransi *Azotobacter* (sesuai sub bab 3.2.2.). misal K1, K2, dan K3. Kultur starter dibuat dengan cara 1 ose stok kultur *Azotobacter* diinokulasikan ke dalam 10 ml media cair $\frac{1}{2}$ NB dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu ruang. Selanjutnya 5 ml kultur *Azotobacter* uji diinokulasikan dalam 45 ml media cair $\frac{1}{2}$ NB. Setelah diinkubasi selama μ jam, dipapar HgCl_2 sesuai konsentrasi perlakuan, dan dilakukan penghitungan kepadatan sel menggunakan Haemocytometer (jumlah sel/ml). Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang di atas *Rotary Shaker*

dengan kecepatan 100 rpm. Pengukuran bioakumulasi Hg^{2+} dilakukan pada 24 jam inkubasi setelah terpapar HgCl_2 .

Kultur perlakuan setelah 24 jam disentrifugasi dengan kecepatan 4000 rpm selama 60 menit untuk memisahkan filtrat dan pelet sel *Azotobacter*. Pada filtrat ditambahkan 2 tetes HNO_3 , dipanaskan $< 85^\circ \text{C}$ 30 menit. Pengukuran konsentrasi Hg^{2+} di filtrat dilakukan dengan menggunakan AAS (*Atomic Absorbtion Spectrophotometry*). Konsentrasi Hg^{2+} pada filtrat medium merupakan konsentrasi logam Hg^{2+} sisa (Ks) yang tidak diakumulasi dan tidak divolatilisasi oleh *Azotobacter*. Konsentrasi yang mampu diakumulasi oleh *Azotobacter* adalah

$$R = K_0 - K_s$$

R = Konsentrasi Hg^{2+} yang diakumulasi oleh *Azotobacter*

K_0 = Konsentrasi awal Hg^{2+} dalam media kontrol tanpa inokulum *Azotobacter*

K_s = Konsentrasi akhir Hg^{2+} sisa pada filtrat media

Efisiensi bioakumulasi Hg^{2+} oleh *Azotobacter* adalah

$$E = \frac{K_0 - K_s}{K_0} \times 100 \%$$

E = Efisiensi bioakumulasi merkuri Hg^{2+} oleh *Azotobacter*

K_0 = Konsentrasi awal Hg^{2+} dalam media kontrol tanpa inokulum *Azotobacter*

K_s = Konsentrasi akhir Hg^{2+} pada filtrat media

3.2.5 Viabilitas *Azotobacter*

Kultur perlakuan yang telah terpapar HgCl_2 sesuai konsentrasi perlakuan, diambil sebanyak 1 ml, dilakukan pengenceran hingga 10^{-7} , diinokulasikan pada media *Nutrient Agar* (NA) dengan menggunakan metode *pour plate*. Koloni yang tumbuh diamati. Pengamatan dilakukan pada pengenceran 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} .

3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perbedaan perlakuan diuji dengan *Analysis of Varians* (ANOVA) dengan taraf kepercayaan ($p = 5 \%$), uji beda nyata dilakukan dengan uji beda nyata terkecil (BNT).

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Isolasi *Azotobacter*

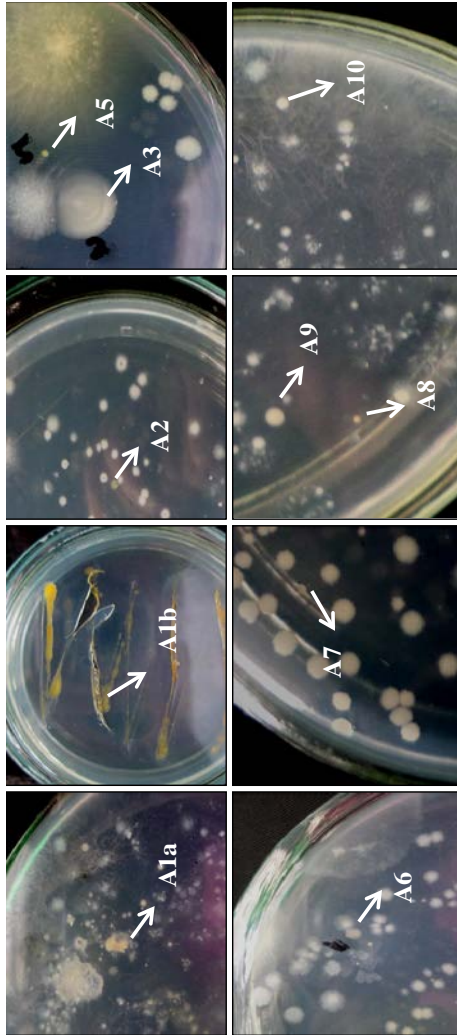
Isolasi *Azotobacter* dilakukan pada tanah pertanian yang berasal dari lahan *eco urban farming* ITS. *Azotobacter* merupakan bakteri penambat nitrogen non simbiotik (Rojas *et al.*, 2011) yang banyak ditemukan di tanah terutama di rhizosfer lahan pertanian (Mazinani *et al.*, 2012), selain itu *Azotobacter* juga merupakan bakteri resisten merkuri (BRM) dan dapat berperan sebagai biakumulator merkuri (Zulaika, 2013). Berdasarkan hasil analisis merkuri pada sampel tanah dan sampel air, lahan *eco urban farming* ITS sudah tercemar merkuri sebesar 0,002 mg/L pada sampel air dan 0,004 mg/L pada sampel tanah. Konsentrasi ini telah melebihi ambang batas yang telah ditetapkan oleh pemerintah sesuai dengan PP. No.82/2001 yaitu 0,001 mg/L. Isolat *Azotobacter* resisten merkuri yang diisolasi dari lahan *eco urban farming* ITS diharapkan dapat digunakan sebagai agen bioremediasi di lahan pertanian yang tercemar merkuri.

Sampel yang mengandung inokulum ditumbuhkan pada media selektif *Azotobacter* Mannitol Agar yang mengandung 0,1 mg/L HgCl_2 dengan menggunakan metode spread plate. Pada media ditambahkan HgCl_2 dengan tujuan untuk memperoleh isolat yang mampu resisten terhadap merkuri. Metode spread plate digunakan untuk memudahkan pengambilan koloni saat isolasi dan purifikasi. Menurut Cain *et al* (2013), media selektif merupakan media yang didesain untuk menghambat pertumbuhan satu kelompok bakteri atau lebih tanpa menghambat pertumbuhan bakteri yang diinginkan. Media *Azotobacter* mannitol agar merupakan media bebas nitrogen dengan mannitol sebagai sumber karbon. *Azotobacter* mampu menggunakan berbagai macam gula, alkohol, atau garam dari asam organik sebagai sumber karbon (Holt *et al*, 1994). Dengan media selektif *Azotobacter*, hanya bakteri *Azotobacter* pemfiksasi nitrogen saja

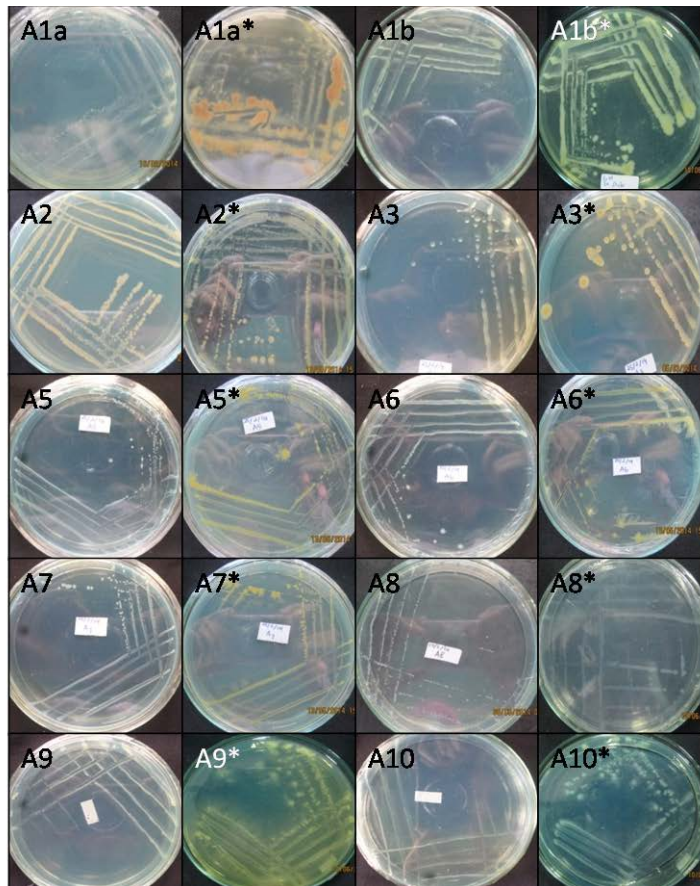
yang mampu tumbuh pada media tersebut. Media ini sangat sesuai digunakan untuk isolasi, kultivasi dan identifikasi *Azotobacter* dari tanah (*Azotobacter Agar Mannitol*[®] Himedia'2011). Berdasarkan penelitian Aquilanti *et al.* (2004), media mannitol bebas nitrogen merupakan media yang cocok digunakan untuk memastikan *Azotobacter chroococcum* yaitu ditunjukkan dengan adanya perubahan warna koloni secara bertahap menjadi coklat.

Pada penelitian ini, media selektif *Azotobacter Mannitol Agar* yang digunakan untuk isolasi mengalami modifikasi dengan penambahan natrium molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dan BTB. BTB dalam media digunakan sebagai indikator pH yang ditunjukkan dengan adanya perubahan warna media (Saraswati *et al.*, 2007), sedangkan molibdenum ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) merupakan unsur yang sangat dibutuhkan bagi bakteri penambat nitrogen karena molibdenum merupakan salah satu komponen dalam enzim nitrogenase yang berfungsi dalam proses fiksasi nitrogen (Ristiati *et al.*, 2008).

Koloni yang dipurifikasi dari hasil isolasi sampel tanah lahan *eco urban farming* ITS berwarna krem hingga coklat setelah 3-5 hari inkubasi, koloni tersebut diasumsikan merupakan bakteri *Azotobacter chroococcum* (Saraswati *et al.*, 2007). Hasil isolasi *Azotobacter* menghasilkan 10 isolat (Gambar 4.1) yaitu A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10. Isolat yang telah dipurifikasi (Gambar 4.2) kemudian dilanjutkan dengan pengamatan karakteristik morfologi koloni (Tabel 4.1).



Gambar 4.1. Isolat *Azotobacter* yang Diisolasi Dari Tanah Lahan *Eco Urban Farming* ITS.



Gambar 4.2. Morfologi Koloni Tiap Isolat *Azotobacter*.

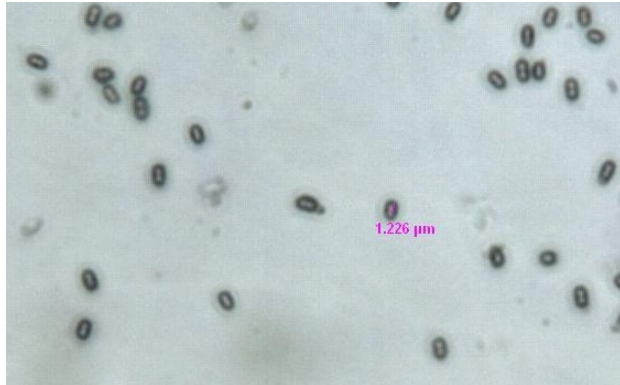
Keterangan gambar : (tanpa tanda * : koloni berumur muda (24 jam); tanda * : koloni berumur tua (> 1 bulan).

Tabel 4.1. Karakteristik Morfologi Koloni *Azotobacter*

Isolat	Pengamatan					
	Bentuk koloni	Elevasi	Tepi	Warna koloni muda	Warna koloni tua (> 1 bln)	Ukuran koloni
A1a	Irregular	Flat	Undulate	Krem Slimy (berair)	Coklat	1 cm
A1b	Circular	Convex	Entire	Krem bening Slimy (berair)	Krem kecoklatan	2 mm
A2	Circular	Convex	Entire	Krem kecoklatan	Coklat muda	2 mm
A3	Circular	Pulvinate	Entire	Krem bening Slimy (berair)	Kuning; pusat koloni: orange	3 mm
A5	Circular	Convex	Undulate	Putih susu	Kuning kecoklatan	3 mm
A6	Circular	Convex	Erose	Putih susu	Krem kecoklatan	3 mm
A7	Circular	Convex	Erose	Putih susu	Krem	2 mm
A8	Circular	Flat	Entire	Transparan	Transparan	2 mm
A9	Irregular	Flat	Undulate	Putih susu	Krem kekuningan	3 mm
A10	Irregular	Raised	Erose	Putih susu	Krem	5 mm
					Bentuk sel	Gram
					Basil pendek	(-)
					Basil pendek	(-)
					Coccus	(-)
					Basil pendek	(-)
					Basil pendek	(-)
					Basil pendek	(-)
					Basil pendek	(-)
					Basil pendek	(-)

Pada tabel 4.1, semua isolat merupakan bakteri Gram (-), memiliki kista (+), dengan bentuk sel basil pendek kecuali isolat A2 yang memiliki bentuk sel coccus. Menurut Holt *et al* (1994), *Azotobacter* memiliki ciri-ciri selnya berbentuk batang dengan ujung membulat, batang pendek hingga bulat, umumnya diameter selnya berukuran $\geq 2 \mu\text{m}$ dengan panjang $4 \mu\text{m}$. Gram (-), bersifat pleomorfik, selnya dapat individu, berpasangan, atau mengelompok dengan bentuk tidak beraturan dan kadang-kadang membentuk rantai dengan panjang yang bervariasi. *Azotobacter* tidak membentuk endospora tetapi membentuk cysta. *Azotobacter* bersifat motil karena memiliki flagela peritrik atau non motil. *Azotobacter* bersifat aerob tetapi masih dapat hidup dengan tekanan oksigen rendah (Holt *et al.*, 1994). Menurut Gomare *et al.* (2013), *Azotobacter* dapat ditemukan pada tanah netral hingga basa, Gram (-), motil, pleomorfi, aerob, selnya berbentuk batang hingga bulat, memproduksi slime eksopolisakarida (EPS) dalam jumlah besar, memiliki cysta, memiliki tingkat respirasi yang sangat tinggi, bersifat mesofilik dengan temperatur optimum yaitu 30°C . Menurut Sandeep *et al.* (2011), *Azotobacter chroococcum* mampu memproduksi pigmen berwarna coklat hingga kehitaman dan mampu menggunakan mannitol, glukosa, dan sukrosa sebagai sumber karbon.

Pewarnaan cysta dilakukan untuk memastikan bahwa isolat yang didapatkan adalah *Azotobacter*. Pembentukan cysta diinduksi dengan cara menumbuhkan isolat *Azotobacter* pada media Burk's dengan butanol sebagai sumber karbon selama 7 hari (Stella & Suhaimi, 2010). Proses pembentukan cysta terjadi pada fase stasioner akhir setelah ditumbuhkan pada media yang mengandung butanol sebagai sumber karbon (Barleman & Bauer, 2004). Sel bakteri yang membentuk cysta dapat diwarnai dengan pewarna Giemsa. Hasil pewarnaan menunjukkan cysta mempunyai ukuran lebih kecil atau lebih pendek dan dinding cysta tampak menebal. Keberadaan cysta merupakan karakter kunci pada genus *Azotobacter* (Gambar 4.3).



Gambar 4.3. *Azotobacter* yang Membentuk Cysta
(Dokumentasi pribadi, 2014).

Menurut Madigan *et al.* (2012), *Azotobacter* dapat membentuk struktur istirahat (*resting cell*) yang disebut cysta dimana sel dikelilingi oleh dinding sel yang tebal dan cysta resisten terhadap desikasi serta UV tetapi tidak resisten terhadap panas atau suhu tinggi.

4.2 Uji Resistensi Terhadap HgCl_2

Uji resistensi dilakukan untuk mengetahui tingkat resistensi isolat *Azotobacter* dan untuk mengetahui *range finding test* perlakuan selanjutnya yaitu uji bioakumulasi Hg^{2+} . Uji resistensinya terhadap HgCl_2 dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat *Azotobacter* pada media selektif *Azotobacter* slant agar yang mengandung HgCl_2 dari konsentrasi 0,5 mg/L hingga konsentrasi yang mampu ditoleransi oleh isolat *Azotobacter*.

Resistensi isolat *Azotobacter* terhadap HgCl_2 bervariasi dan hanya 3 isolat yang masih mampu tumbuh pada konsentrasi 20 mg/L HgCl_2 yaitu isolat A5, A6 dan A9 (Tabel 4.2).

Tabel 4.2. Resistensi *Azotobacter* Terhadap HgCl_2

Isolat	Pertumbuhan isolat <i>Azotobacter</i> pada media yang mengandung HgCl_2 (mg/L)				
	0,5	5	10	15	20
A1a	+++	++	++	-	-
A1b	+++	+++	-	-	-
A2	+++	+++	-	-	-
A3	+++	+++	-	-	-
A5	+++	+++	+++	+++	++
A6	+++	+++	+++	+++	++
A7	+++	+++	+++	+++	-
A8	+++	+++	-	-	-
A9	+++	+++	+++	+	+
A10	+++	+++	+++	++	-

Ket : +++ (baik), ++ (cukup baik), + (kurang baik).

Menurut Ray *et al.* (1989), beberapa spesies dari genus *Azotobacter* merupakan bakteri resisten merkuri yang mampu mereduksi merkuri dari lingkungan hidupnya. Berdasarkan penelitian Zulaika *et al.* (2012), genus *Azotobacter* S8 yang diisolasi dari Kalimas Surabaya resisten terhadap merkuri HgCl_2 sampai dengan 11 mg/L dan merupakan salah satu genus bakteri resisten merkuri. Berdasarkan hasil pengukuran sampel tanah, konsentrasi kandungan Hg adalah 0,004 mg/L dan sampel air adalah 0,002 mg/L. Isolat *Azotobacter* yang diisolasi menunjukkan sifat resistensi yang lebih tinggi dari konsentrasi merkuri dihabitatnya. Menurut Manampiring dan Keppel (2011), suatu bakteri dikatakan resisten merkuri apabila bakteri tersebut dapat bertahan pada konsentrasi merkuri 0,01 ppm.

Berdasarkan pada tabel 4.2, semua isolat *Azotobacter* mampu tumbuh dengan baik pada konsentrasi 0,5 dan 5 mg/L HgCl_2 kecuali isolat A1a yang mampu tumbuh cukup baik pada konsentrasi 5 mg/L HgCl_2 . Pada konsentrasi 10 mg/L HgCl_2 , hanya isolat A5, A6, A7, A9, dan A10 yang mampu tumbuh dengan baik. Pada konsentrasi 15 mg/L HgCl_2 terdapat 3 isolat (A5, A6, A7) mampu tumbuh baik, dan pada konsentrasi 20

mg/L HgCl_2 hanya 2 isolat yang mampu tumbuh cukup baik yaitu A5, dan A6.

Pada bakteri dan juga Archaea, resistensi terhadap merkuri didasarkan pada kemampuannya mereduksi Hg^{2+} menjadi bentuk volatil Hg^0 yang dikatalisis oleh enzim merkuri reduktase (*mer A*) yang merupakan gen *mer operon*. Gen *mer operon* banyak ditemukan di plasmid (Ramond, 2009). Menurut Das & Dash (2012), resistensi bakteri terhadap merkuri karena bakteri memiliki gen resisten merkuri yang disebut gen *mer operon*. Gen *mer operon* pada bakteri selain ditemukan di plasmid, juga terdapat di kromosom atau transposon (Barkay *et al.*, 2003). Gen resisten merkuri (*mer operon*) mempunyai 2 tipe yaitu *mer operon* spektrum sempit yang hanya resisten terhadap merkuri anorganik dan *mer operon* spektrum luas yang mampu resisten terhadap merkuri anorganik dan merkuri organik (Bogdanova, 2001). Menurut Ray *et al.* (1989), *Azotobacter* merupakan bakteri resisten merkuri sehingga mampu mereduksi merkuri Hg^{2+} menjadi Hg^0 dari lingkungan hidupnya. Berdasarkan penelitian Ghosh *et al* (1997), *Azotobacter* juga merupakan bakteri resisten merkuri spektrum luas yang mampu mengubah merkuri organik menjadi merkuri anorganik menggunakan enzim organomercuri liase dan mereduksi ion Hg^{2+} dari merkuri anorganik menjadi Hg^0 volatil menggunakan enzim merkuri reduktase.

Gen resisten merkuri (*mer operon*) yang dimiliki oleh *Azotobacter* juga dapat berasal dari bakteri lain yang terdapat di lingkungannya. Menurut Narita (2003), gen resisten merkuri pada plasmid dan atau transposon dapat memfasilitasi terjadinya transfer gen secara horisontal dalam populasi bakteri di lingkungan. Sehingga adanya transfer gen tersebut, selain berperan dalam hal resistensi bakteri di lingkungan, juga memberikan keuntungan dalam hal adaptasi pada lingkungan yang tercemar merkuri.

Isolat *Azotobacter* yang berhasil diisolasi menunjukkan tingkat resistensi terhadap merkuri yang berbeda-beda. Perbedaan tingkat resistensi terhadap merkuri HgCl_2 disebabkan oleh

susunan gen *mer* operon yang berbeda disetiap isolat. Komponen gen *mer* operon pada setiap spesies adalah tidak sama, terdapat variasi komposisi gen-gen penyusunnya (Narita, 2003). Selain itu, perbedaan kemampuan resistensi juga dipengaruhi oleh perbedaan tingkat ekspresi gen *mer operon* antara spesies bakteri satu dengan spesies bakteri yang lain (Ranjard *et al.* 1997).

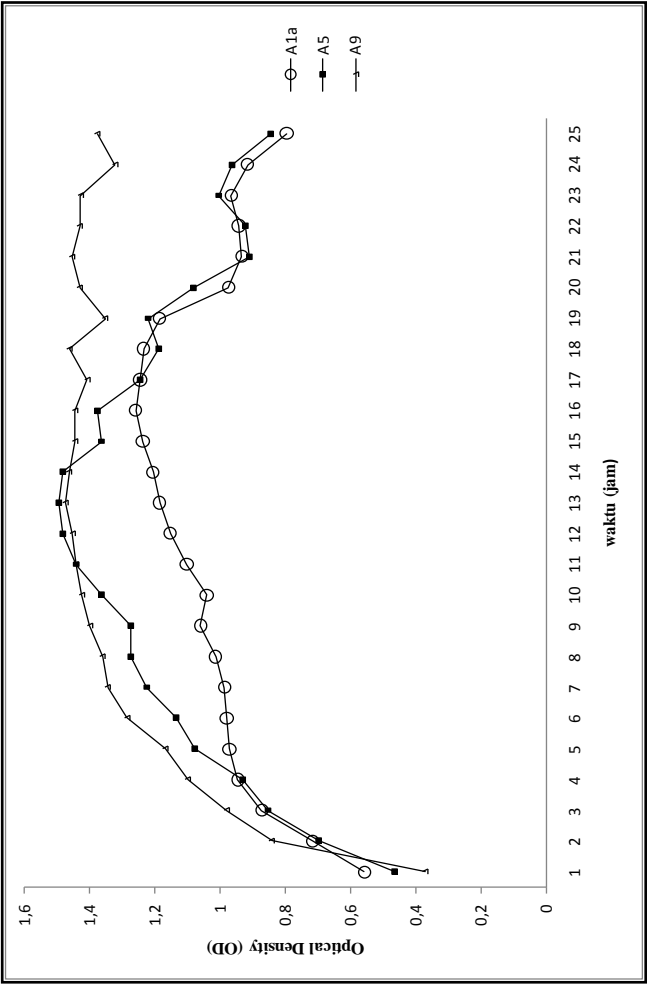
4.3 Kurva Pertumbuhan Isolat *Azotobacter*

Isolat yang digunakan pada uji bioakumulasi adalah isolat yang paling resisten dengan morfologi koloni yang mempunyai perbedaan menyolok, isolat tersebut adalah A1a, A5, dan A9. Pemilihan ketiga isolat tersebut didasarkan pada perbedaan karakteristik morfologi koloni tua dan tingkat resistensinya terhadap HgCl_2 diatas 10 mg/L. Isolat A1a mempunyai warna koloni coklat, resisten pada 10 mg/L HgCl_2 , A5 kuning kecoklatan dan A9 krem kekuningan yang resisten terhadap HgCl_2 20 mg/L.

Siklus hidup bakteri dapat divisualisasikan melalui kurva pertumbuhan yang menggambarkan pola pertumbuhan bakteri dari fase adaptasi atau fase lag, eksponensial (log), stasioner dan kematian. Pada penelitian ini, media cair Nurient Broth (NB) untuk tumbuh telah mengalami modifikasi yaitu dengan pengurangan konsentrasi 50 % media NB, artinya konsentrasi media NB secara normal adalah 8 gr/1000 mL dimodifikasi menjadi 4 gr/1000 mL. Pengurangan konsentrasi media NB ini dilakukan karena media NB yang digunakan secara normal untuk media kultur kurva pertumbuhan menunjukkan kurva pertumbuhan *Azotobacter* sampai fase stasioner melebihi 24 jam. Berdasarkan penelitian Dhanraj *et al* (2012) pertumbuhan maksimum (puncak eksponensial) *Azotobacter chroococcum* pada jam ke-48. Penelitian Munawar dan Elfita (2011) juga menunjukkan bahwa fase puncak eksponensial isolat *Azotobacter* yang dikultur pada media Zobell cair yang ditambahkan minyak mentah terjadi pada jam ke-48. Pengurangan konsentrasi media NB dilakukan sebagai bentuk strategi untuk mempercepat fase

stasioner *Azotobacter* yang kurang dari 24 jam. Pada penelitian ini, media kultur juga ditambahkan HgCl_2 0,1 mg/L dengan tujuan untuk menjaga sifat resistensinya terhadap merkuri (HgCl_2).

Hasil kurva pertumbuhan *Azotobacter* A1a, A5, dan A9 menunjukkan pola pertumbuhan yang hampir sama. Ketiga pola pertumbuhan isolat *Azotobacter* langsung memasuki fase eksponensial tanpa melalui fase lag (Gambar 4.4). Fase lag merupakan fase adaptasi dimana bakteri belum menunjukkan adanya pertumbuhan. Pada fase lag, terjadi peningkatan ukuran sel, sel bakteri sedang mempersiapkan komponen-komponen untuk proses pembelahan seperti sintesis DNA, enzim-enzim intraseluler, dan lain-lain (Al-Qadiri *et al.*, 2008). Menurut Madigan *et al.* (2012), ada tidaknya fase lag pada kurva pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh waktu inokulasi dan usia inokulum. Jika inokulum diinokulasikan pada media baru yang sama pada saat fase eksponensial, maka pertumbuhan bakteri langsung melanjutkan fase eksponensial tanpa melalui fase lag lagi. Sedangkan jika inokulum diinokulasikan ke media baru pada saat memasuki fase kematian, maka pertumbuhan bakteri akan mengalami fase lag terlebih dahulu sebelum ke fase eksponensial, hal ini disebabkan sel-sel bakteri membutuhkan waktu untuk mempersiapkan komponen-komponen pembelahan sel terlebih dahulu.



Gambar 4.4. Kurva Pertumbuhan Isolat *Azotobacter* A1a, A5 dan A9.

Pada penelitian ini stok kultur diinokulasikan ke media kurva pertumbuhan setelah 24 jam inkubasi pada media yang sama. Pada jam tersebut, kultur bakteri diperkirakan masih dalam fase eksponensial akhir dan akan memasuki fase stasioner. Isolat A1a mulai memasuki fase eksponensial pada jam ke-1 hingga jam ke-17, sedangkan pada jam ke-1 hingga jam ke-13 merupakan fase eksponensial untuk isolat A5 dan A9. Berdasarkan gambar 4.4, pada kurva pertumbuhan dapat diketahui bahwa rata-rata fase eksponensial isolat A1a adalah jam ke-9, sedangkan rata-rata fase eksponensial isolat A5 dan A9 adalah jam ke-7. Fase eksponensial merupakan fase dimana sel-sel bakteri berada pada kondisi yang sangat stabil atau seimbang, tingkat pembelahan sel-sel sangat tinggi (Madigan *et al.*, 2012), dan laju pertumbuhannya konstan (Al- Qadiri *et al.*, 2008).

Pola pertumbuhan isolat A1a mulai menurun pada jam ke-18, sedangkan isolat A5 dan A9 mulai menurun pada jam ke-14, selanjutnya akan memasuki fase stasioner dan fase kematian. Fase stasioner dicirikan dengan tidak adanya kenaikan atau penurunan jumlah sel dalam populasi artinya jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati. Hal ini disebabkan karena nutrisi dalam media semakin berkurang. Sedangkan fase kematian merupakan fase dimana sel-sel bakteri mengalami kematian yang disebabkan karena nutrisi dalam media telah habis. Pada gambar 4.4 fase kematian terlihat setelah memasuki jam ke-25 pada isolat A1a dan A5, sedangkan pada isolat A9 sampai jam ke-25 masih dalam fase stasioner.

4.4 Uji Bioakumulasi Hg

Uji bioakumulasi isolat *Azotobacter* dilakukan untuk mengukur kemampuan bioakumulasi isolat *Azotobacter* yang diisolasi dari lahan *eco urban farming* ITS terhadap HgCl_2 . Isolat *Azotobacter* yang digunakan adalah isolat A1a, A5, dan A9. Konsentrasi perlakuan yang digunakan adalah konsentrasi yang lebih rendah dari konsentrasi maksimal yang mampu ditoleransi oleh isolat *Azotobacter* sehingga kemampuan sel-sel dalam

mengakumulasi HgCl_2 dapat terjadi secara optimal. Dalam penelitian ini, konsentrasi perlakuan yang digunakan dalam uji bioakumulasi yaitu 5, 10, dan 15 mg/L HgCl_2 . Kultur stok yang telah dibuat, diinokulasikan pada media cair $\frac{1}{2}$ NB kemudian diinkubasi selama μ jam (rata-rata fase eksponensial) sebelum dipapar HgCl_2 sesuai konsentrasi perlakuan yaitu untuk isolat A1a diinkubasi selama 9 jam sedangkan isolat A5 dan A9 diinkubasi selama 7 jam. sebelum dipapar dengan HgCl_2 , terlebih dahulu dilakukan penghitungan jumlah sel dengan menggunakan Haemocytometer (sel/ml) untuk mengetahui kepadatan/jumlah sel yang akan diuji kemampuan bioakumulasinya terhadap HgCl_2 (Lampiran 11). Pada penelitian ini, bioakumulasi Hg diukur pada filtrat media hasil sentrifugasi yang merupakan Hg^{2+} sisa yang tidak diakumulasi dan tidak divolatilisasi oleh isolat *Azotobacter*. Konsentrasi yang diakumulasi dapat diketahui dengan cara mengurangi konsentrsi awal dengan konsentrsi sisa pada filtrat media.

Bioakumulasi merupakan akumulasi logam atau polutan secara intraseluler yang terjadi dalam 2 tahap yaitu (1) proses cepat atau biosorpsi pada permukaan sel, dan (2) proses lambat atau bioakumulasi, termasuk pengangkutan logam atau polutan ke dalam sel melewati membran sel (Chojnacka, 2010). Selain itu, *Azotobacter* dapat menghasilkan eksopolisakarida (EPS) yang berperan dalam biosorpsi logam. Eksopolisakarida dapat mengadsorpsi logam seperti Hg^{2+} karena EPS bermuatan negatif dan logam membentuk ikatan ligan dengan EPS (Erni dan Hindersah, 2011).

Dinding sel bakteri sangat melimpah dengan gugus-gugus yang mengandung muatan negatif seperti fosforil (PO_4^{3-}), karboksil (COO^-), sulfihidril atau tiol ($-\text{SH}$) dan hidroksil ($-\text{OH}$) sehingga akan terjadi interaksi ion logam yang bermuatan positif dengan muatan negatif tersebut membentuk ikatan ligan (Murthy *et al.*, 2012). Menurut Zulaika *et al.* (2012), bakteri yang mempunyai habitat tercemar logam berat akan resisten terhadap logam berat tersebut melalui mekanisme biosorpsi dan atau

bioakumulasi. Mekanisme biosorpsi biasanya berhubungan dengan adanya eksopolisakarida (EPS) pada dinding sel bakteri yang dapat berfungsi sebagai pengkelat logam di permukaan sel. Sedangkan bioakumulasi berhubungan dengan adanya gen *operon* sesuai dengan logam yang diakumulasi.

Pada penelitian ini konsentrasi HgCl_2 yang terukur, ada yang mengalami kenaikan dan juga penurunan. Perubahan konsentrasi HgCl_2 pada media dapat disebabkan deviasi dari AAS. Hasil pengukuran bioakumulasi pada ketiga isolat *Azotobacter* menunjukkan bahwa isolat A5 memiliki kemampuan bioakumulasi yang rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan isolat A1a dan A9. Pada pemaparan 5 mg/L HgCl_2 , efisiensi bioakumulasi isolat A5 yaitu sebesar 89 %, pada pemaparan 10 mg/L HgCl_2 , efisiensi bioakumulasinya 79 %, sedangkan pada pemaparan 15 mg/L HgCl_2 , efisiensi bioakumulasinya 87 %. Efisiensi bioakumulasi isolat A9 juga lebih tinggi jika dibandingkan dengan isolat A1a. Pada pemaparan 5, 10, dan 15 mg/L HgCl_2 , efisiensi biokumulasinya berturuturut adalah 87 %, 77 % dan 69 % (Tabel 4.3 dan Gambar 4.5).

Kemampuan bioakumulasi yang tinggi pada isolat *Azotobacter* A5 dan A9, sesuai dengan tingkat resistensinya yang tinggi terhadap HgCl_2 yaitu mencapai 20 mg/L HgCl_2 , dan kemampuan bioakumulasi isolat *Azotobacter* A1a yang relatif rendah mempunyai tingkat resistensi terhadap HgCl_2 yang relatif rendah pula yaitu 10 mg/L HgCl_2 .

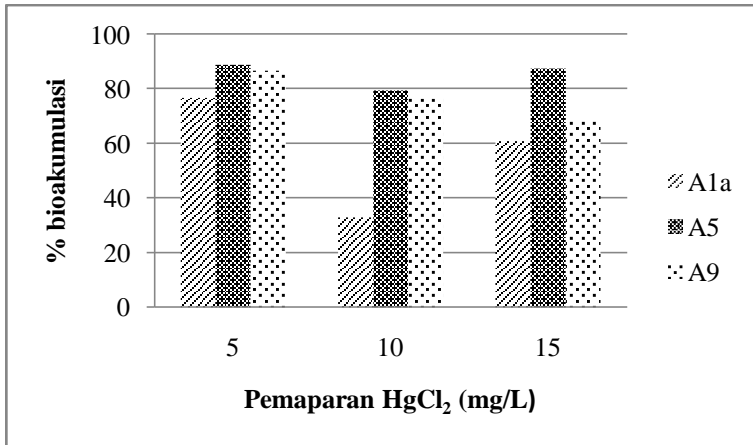
Tabel 4.3. Bioakumulasi Merkuri Isolat *Azotobacter*

Pemapan ran HgCl_2 (mg/L)	Hg^{2+} terukur (mg/L)	Bioakumulasi Hg^{2+} (mg/L)/ $4,6 \times 10^7$ sel/mL			Efisiensi bioakumulasi (%)		
		A1a	A5	A9	A1a	A5	A9
5	5,62	4,31 b	4,99 a	4,88 a	77	89	87
10	9,86	3,25 a	7,84 b	7,56 b	33	79	77
15	14,91	9,09 c	13,04 c	10,28 c	61	87	69

Ket : Angka yang didampingi huruf yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan pada $p=5\%$.

Hasil analisis perlakuan konsentrasi dan bioakumulasi HgCl_2 didapatkan nilai *p value* 0,000 (Lampiran 13). Jika nilai *p value* dibawah $< 0,05$ menunjukkan adanya pengaruh yang signifikan, sebaliknya jika nilai *p value* $> 0,05$ menunjukkan tidak ada pengaruh yang signifikan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi merkuri mempengaruhi bioakumulasi *Azotobacter* terhadap HgCl_2 . Selanjutnya, dilakukan uji Beda nyata terkecil (BNT) dengan tujuan untuk mengetahui dan membandingkan pengaruh antar konsentrasi terhadap bioakumulasi. Hasil analisis didapatkan, semua nilai *p value* $< 0,05$ (Lampiran 14). Hal itu menunjukkan bahwa semua perlakuan konsentrasi berpengaruh signifikan terhadap bioakumulasi HgCl_2 . Namun konsentrasi merkuri tidak mempengaruhi kapasitas bioakumulasi pada masing-masing isolat. Berdasarkan Tabel 4.3 terbukti bahwa kemampuan bioakumulasi tiap isolat memiliki perbedaan disetiap konsentrasi perlakuan.

Bioakumulasi dipengaruhi oleh suhu, ada tidaknya sumber energi, inhibitor dan toksisitas logam berat itu sendiri. Faktor yang mempengaruhi biosorpsi antara lain suhu, pH, jumlah mikroorganisme, keberadaan logam lain, afinitas logam terhadap sel, dan imobilisasi mikroorganisme (Ahmad & Kibret, 2013). Sedangkan menurut Violante (2010), Faktor lingkungan yang mempengaruhi pengikatan ion logam pada permukaan sel bakteri antara lain: pH, kekuatan ionik, suhu, adanya logam lain, dan senyawa organik. Kemampuan bakteri mengakumulasi logam toksik tergantung pada usia sel, gugus fungsional pengikat logam, dan jumlah *reactive site* pengikatan ion logam.



Gambar 4.5. Grafik Efisiensi Bioakumulasi (%) Isolat *Azotobacter*.

Berdasarkan gambar 4.5, ketiga isolat *Azotobacter* uji memiliki efisiensi bioakumulasi lebih dari 50 % kecuali isolat A1a pada pemaparan 10 mg/L HgCl_2 yaitu 33 %. Efisiensi bioakumulasi paling tinggi adalah isolat A5 pada pemaparan 5 mg/L HgCl_2 yaitu 89 %. Berdasarkan penelitian Green-Ruiz (2006), reduksi merkuri lebih efisien pada konsentrasi Hg rendah dari pada konsentrasi Hg tinggi.

4.4 Viabilitas *Azotobacter*

Uji viabilitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan tumbuh isolat *Azotobacter* setelah terpapar HgCl_2 selama 24 jam sesuai konsentrasi perlakuan. Viabilitas merupakan tingkat ketahanan dan kemampuan hidup dari suatu organisme termasuk bakteri pada lingkungan yang baru (Sobariah, 2007). Pada penelitian ini, kultur uji ditumbuhkan pada media NA menggunakan metode *pour plate*. Pengamatan dilakukan pada pengenceran 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} .

Hasil uji viabilitas menunjukkan bahwa, ketiga isolat masih mampu tumbuh dengan baik (tabel 4.4).

Tabel 4.4. Viabilitas *Azotobacter* A1a, A5, dan A9

Isolat	Viabilitas (10^7)		
	5 mg/L HgCl ₂	10 mg/L HgCl ₂	15 mg/L HgCl ₂
A1a	+++	++	++++
A5	+++	+	+
A9	+++	++	++

Ket : ++++ (sangat tinggi), +++ (tinggi), ++ (sedang), + (rendah).

Berdasarkan Tabel 4.4, isolat A1a memiliki viabilitas yang tinggi dibandingkan dengan isolat A5 dan A9. Viabilitas isolat A1a yang tinggi, kurang sesuai dengan kemampuan bioakumulasinya terhadap HgCl₂. Begitu pula dengan isolat A5 dan A9, viabilitasnya juga kurang sesuai dengan kemampuan bioakumulasinya terhadap HgCl₂. Seharusnya apabila kemampuan bioakumulasinya tinggi memiliki viabilitas yang tinggi pula. Isolat A1a memiliki viabilitas yang tinggi namun kemampuan efisiensi bioakumulasinya relatif rendah. Sedangkan isolat A5 dan A9 memiliki viabilitas yang relatif lebih rendah namun memiliki efisiensi bioakumualasi yang tinggi. Berdasarkan karakteristik morfologi koloni, isolat A1a memiliki morfologi koloni yang sangat berlendir atau berair (*slimy*), sedangkan isolat A5 dan A9 memiliki morfologi koloni yang kurang berlendir atau berair (*slimy*). Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat A1a memiliki EPS yang lebih tebal dibandingkan dengan isolat A5 dan A9. Karakteristik morfologi koloni yang berlendir merupakan karakteristik bakteri yang memproduksi EPS (Wacharamusik *et al.*, 2008). EPS merupakan polimer ekstraseluler yang diproduksi oleh mikroorganisme dan diekskresikan di luar selnya atau ke lingkungan sekitarnya. Pada umumnya EPS mengandung monosakarida dan beberapa komponen non-karbohidrat seperti protein, lipid, asetat piruvat, suksinat dan fosfat (Orsod *et al.*, 2012). EPS bakteri selain berfungsi sebagai sarana pelekatan ke permukaan, meningkatkan serapan nutrien di lingkungannya dan sebagai agen pengkhelat logam (Pal & Paul, 2008), EPS juga

bertindak sebagai penghalang yang efisien mencegah masuknya ion-ion logam yang toksik ke dalam sel untuk melindungi sel dari keracunan logam berat (Wacharamusik *et al.*, 2008). Bakteri yang memiliki EPS yang tebal memiliki viabilitas yang lebih tinggi.

“Halaman ini sengaja dikosongkan”

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Sepuluh isolat *Azotobacter* resisten merkuri yang diisolasi dari lahan *eco urban farming* ITS yaitu A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9, dan A10.
2. Semua isolat resisten 5 mg/L HgCl₂. Isolat yang resisten 10 mg/L HgCl₂ adalah A1a, A5, A6, A7, A9, dan A10. Sedangkan isolat yang resisten 15 mg/L HgCl₂ adalah A5, A6, A7, A9, dan A10, dan hanya 3 isolat yang resisten sampai dengan konsentrasi 20 mg/L yaitu isolat A5, A6, dan A9.
3. Kemampuan bioakumulasi HgCl₂ yang tertinggi yaitu isolat A5 (4,99 mg/L) dengan efisiensi bioakumulasi 89 % pada paparan 5 mg/L HgCl₂. Isolat A1a memiliki kemampuan bioakumulasi 4,31 mg/L dengan efisiensi bioakumulasi 77 %. Sedangkan isolat A9 memiliki kemampuan bioakumulasi 4,88 mg/L dengan efisiensi bioakumulasi 87 % pada paparan 5 mg/L HgCl₂.

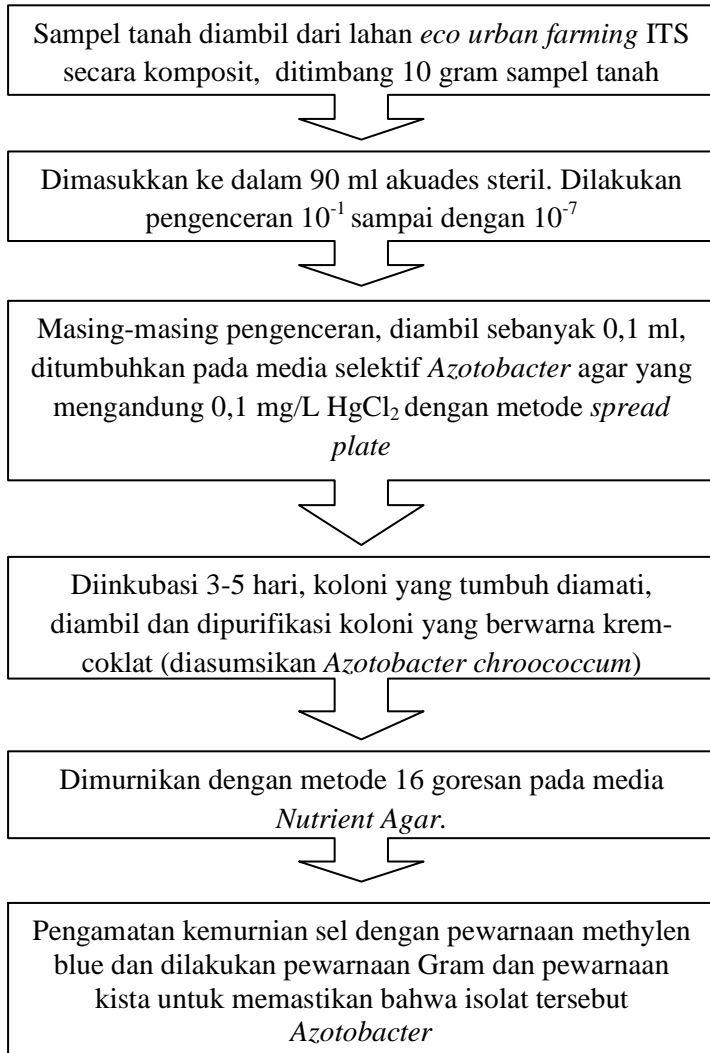
5.2 Saran

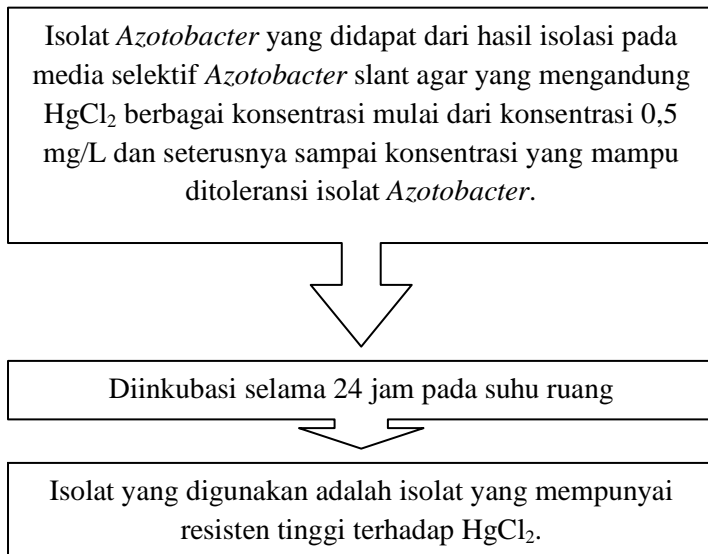
Untuk membuktikan bahwa isolat hasil isolasi pada penelitian ini adalah *Azotobacter chroococcum*, perlu dilakukan karakterisasi dengan marka gen penyandi 16S rRNA.

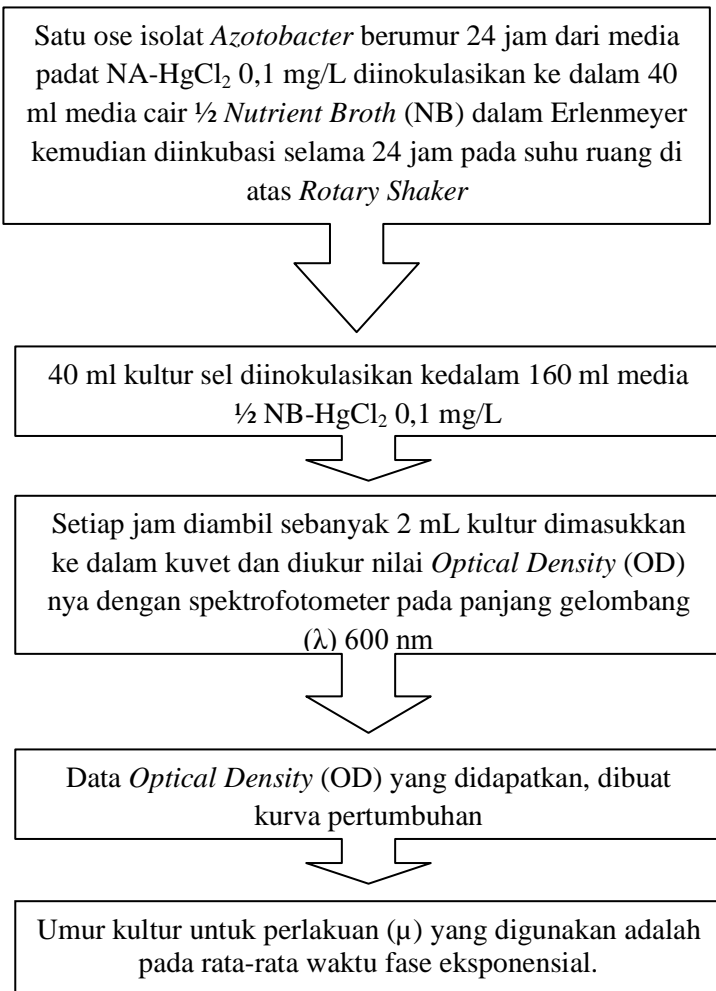
“Halaman ini sengaja dikosongkan”

LAMPIRAN

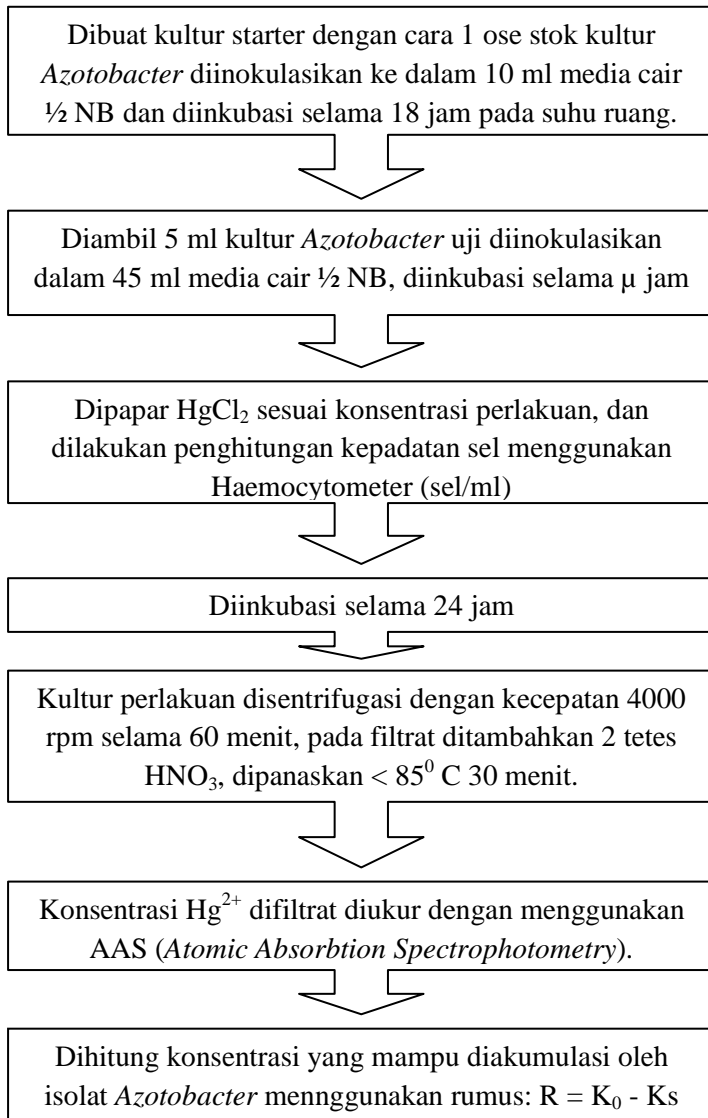
Lampiran 1. Skema Kerja Isolasi *Azotobacter*



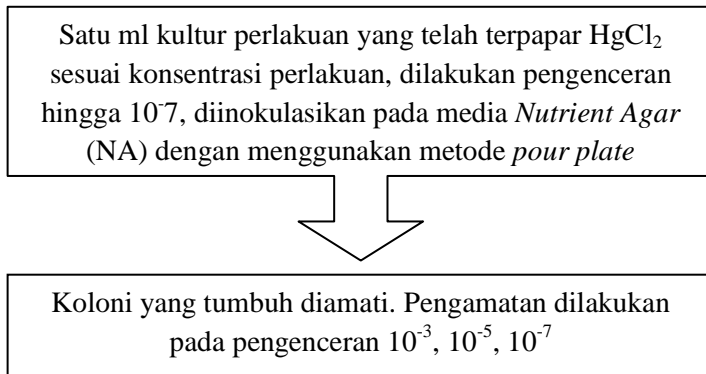
Lampiran 2. Skema Kerja Uji Resistensi Terhadap HgCl_2 

Lampiran 3. Skema Kerja Kurva Pertumbuhan Isolat *Azotobacter*

Lampiran 4. Skema Kerja Uji Bioakumulasi Hg



Lampiran 5. Skema Kerja Viabilitas *Azotobacter*



Lampiran 6. Pengambilan Sampel Di Lahan *Eco Urban Farming* ITS



Lokasi sampling



Green house tempat pengambilan sampel tanah



Pengambilan sampel tanah



Pengambilan sampel air disekitar lahan *eco urban farming* ITS

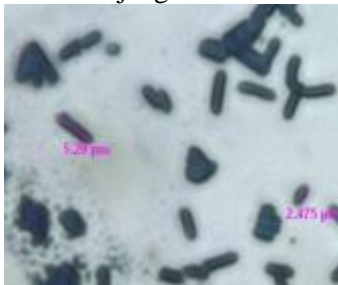
Lampiran 7. Bentuk dan Ukuran Sel Isolat *Azotobacter*



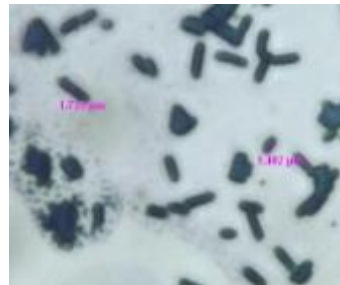
Panjang sel A1a



Lebar sel A1a



Panjang sel A3



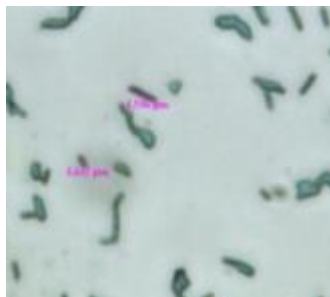
Lebar sel A3



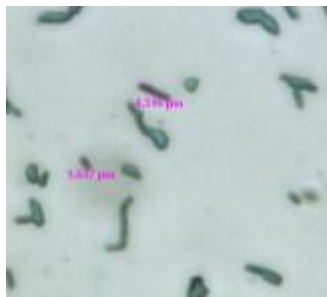
Panjang sel A5



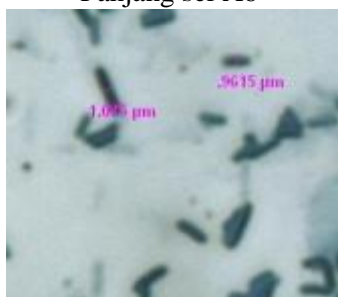
Lebar sel A5



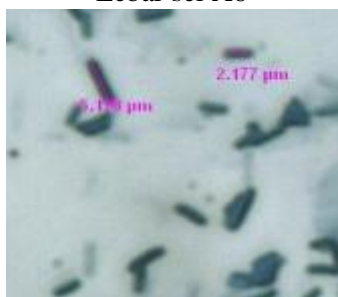
Panjang sel A6



Lebar sel A6



Panjang sel A7



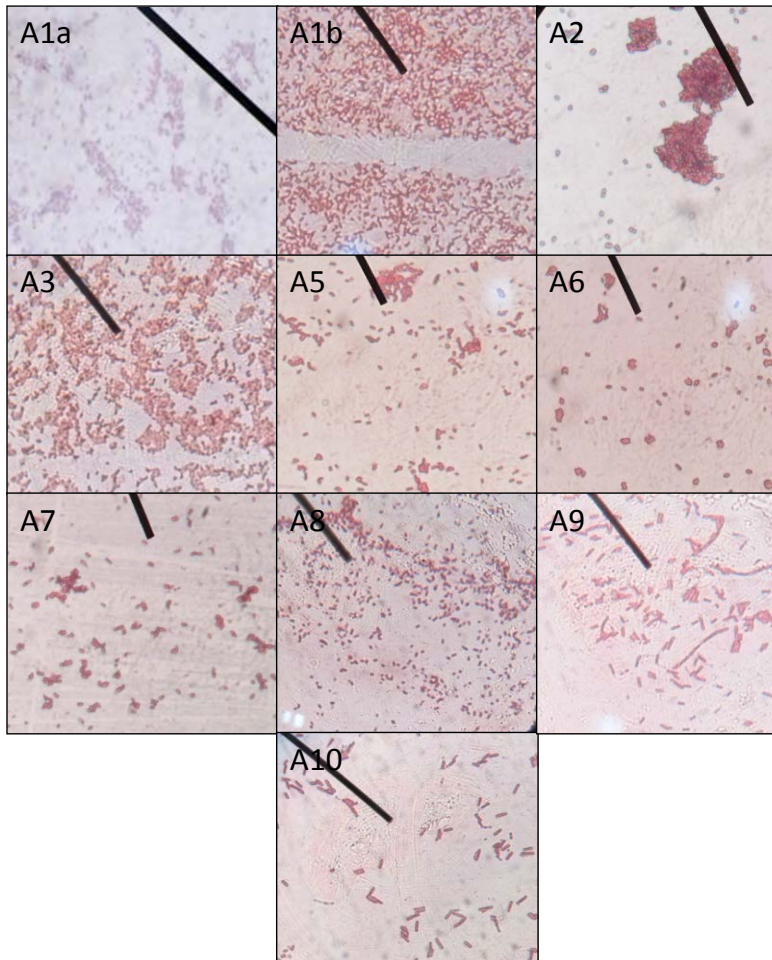
Lebar sel A7

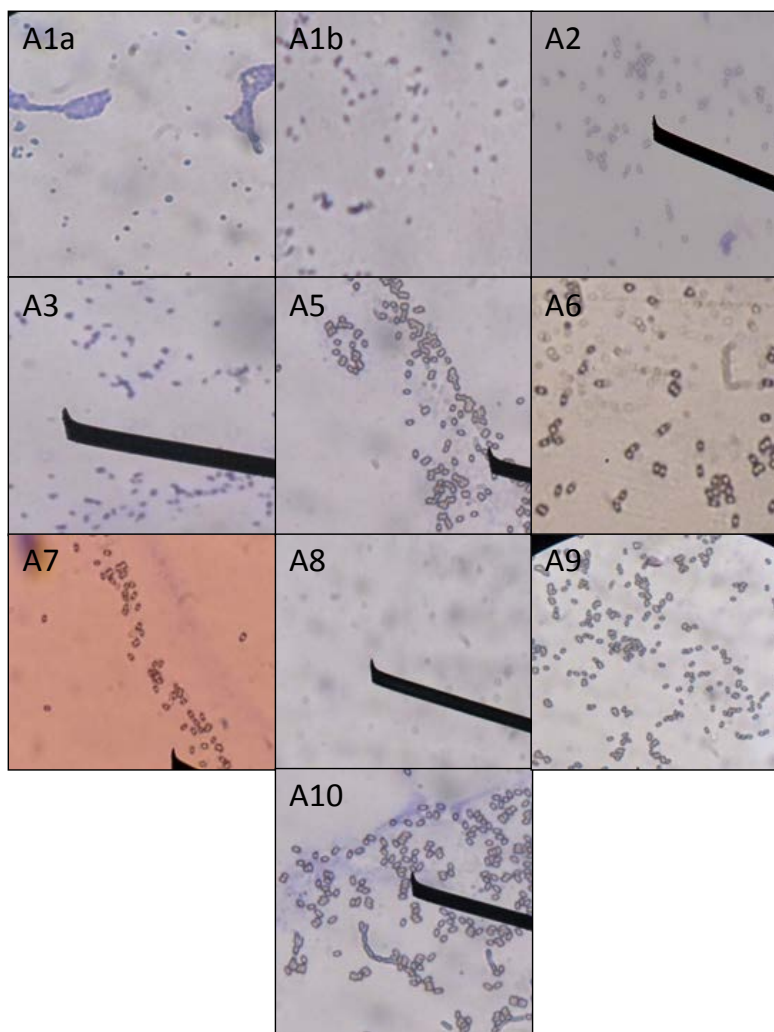


Panjang sel A9



Lebar sel A9

Lampiran 8. Pewarnaan Gram Isolat *Azotobacter*

Lampiran 9. Pewarnaan Cysta Tiap Isolat *Azotobacter*

Lampiran 10. Uji Resistensi Isolat *Azotobacter*

0,5 mg/L HgCl_2



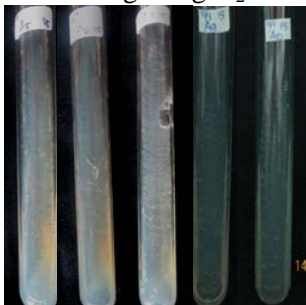
5 mg/L HgCl_2



10 mg/L HgCl_2



15 mg/L HgCl_2

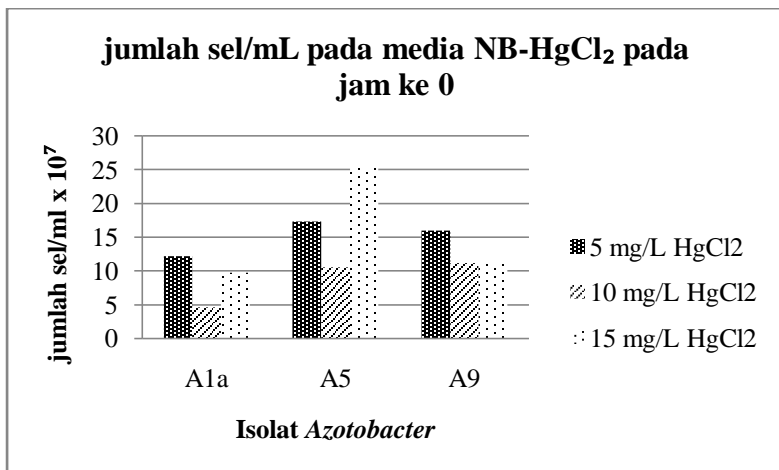


20 mg/L HgCl_2



Lampiran 11. Hasil Perhitungan dan Grafik Jumlah Sel (sel/ml)

Jumlah sel/ml x 10 ⁷								
A1a			A5			A9		
U1	U2	Rata-rata	U1	U2	Rata-rata	U1	U2	Rata-rata
11,95	12,4	12,175	18,95	15,6	17,275	15,55	16,30	15,925
5,45	3,7	4,575	13,60	7,5	10,55	10,3	12,05	11,175
9,3	10,1	9,7	24,70	26,15	25,425	11,15	11,50	11,325



Lampiran 12. Konsentrasi Hg^{2+} Sisa Pada Filtrat Media

Penapa- ran $HgCl_2$ (mg/L)	Konsen- trasi Hg^{2+} (mg/L)	Hg^{2+} terukur (mg/L)	Konsentrasi Hg^{2+} sisa setelah inkubasi 24 jam (mg/L)									
			A1a U1	A1a U2	rata- rata	A5 U1	A5 U2	Rata- rata	A9 U1	A9 U2	rata- rata	rata- rata
5	3,692	5,62	3,46	3,51	3,485	2,38	2,36	2,37	2,56	2,6	2,58	
10	7,385	9,86	6,33	6,9	6,615	4,78	4,55	4,665	5,74	5,52	5,63	
15	11,077	14,91	12,5	12,18	12,34	10,51	10,22	10,365	11,54	11,36	11,45	

Lampiran 13. Uji Analysis of Varians (ANOVA) One-way

One-way ANOVA: bioakumulasi versus konsentrasi

Source	DF	SS	MS	F	P
konsentrasi	2	87,31	43,65	40,34	0,000
Error	6	6,49	1,08		
Total	8	93,80			

S = 1,040 R-Sq = 93,08% R-Sq(adj) = 90,77%

Based on Individual 95% CIs For Mean

Level	N	Mean	StDev	Pooled StDev
5,62	3	5,132	0,200	(----*----)
9,86	3	7,867	1,406	(----*----)
14,91	3	12,668	1,108	(---
-*----)				(---
+-----+--				-----+-----+-----
				6,0 9,0 12,0
15,0				

Pooled StDev = 1,040

Lampiran 14. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

ANOVA

bioakumulasi					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	87.295	2	43.647	40.337	.000
Within Groups	6.492	6	1.082		
Total	93.787	8			

Multiple Comparisons

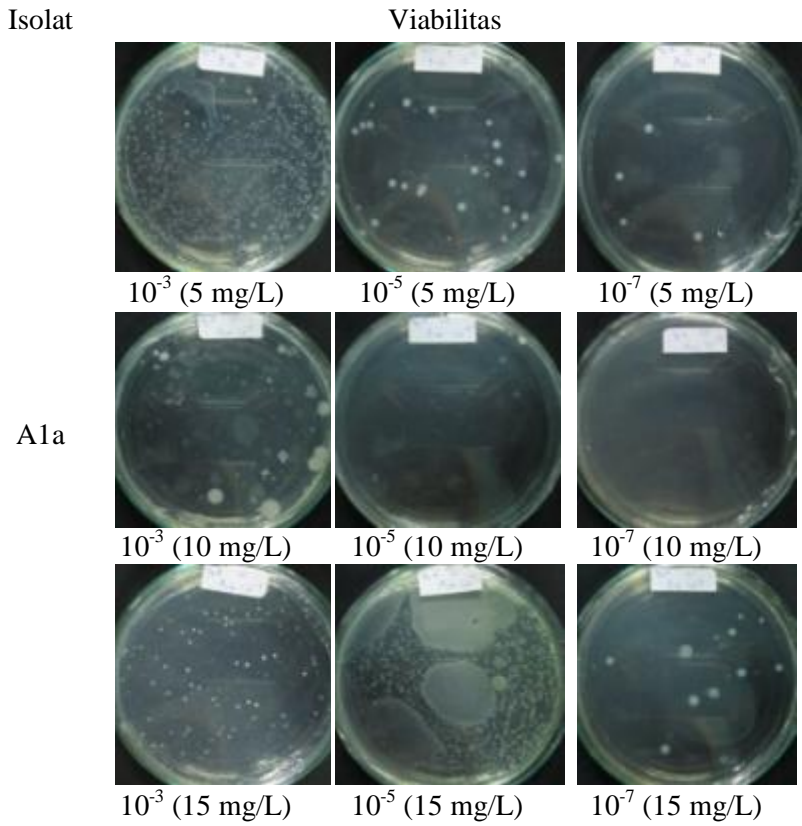
bioakumulasi

LSD

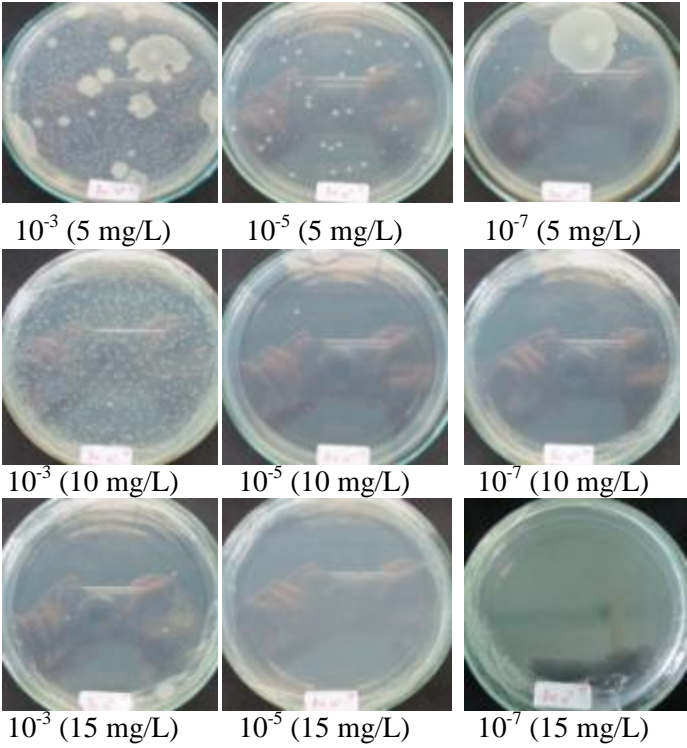
(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
5.62 konsent rasi	9.86 konse ntrasi	-2.734600*	.849341	.018	-4.81286	-.65634
	14.9	-7.534867*	.849341	.000	-9.61313	-5.45660
9.86	5.62	2.734600*	.849341	.018	.65634	4.81286
	14.9	-4.800267*	.849341	.001	-6.87853	-2.72200
14.9	5.62	7.534867*	.849341	.000	5.45660	9.61313
	9.86	4.800267*	.849341	.001	2.72200	6.87853

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

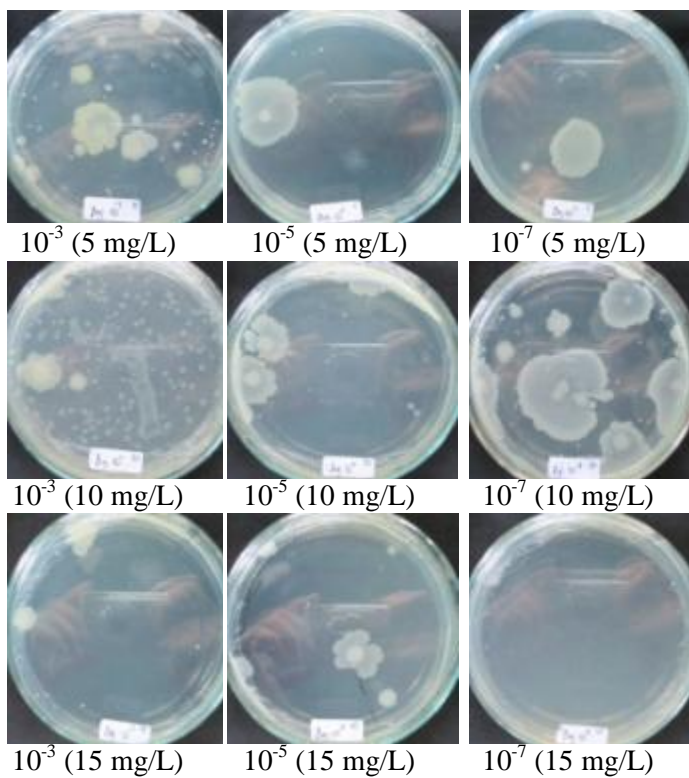
Lampiran 15. Viabilitas Isolat *Azotobacter*



A5



A9



Lampiran 16. Hasil Uji AAS HgCl_2

BALAI PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI
LABORATORIUM
PENELITIAN DAN KONSULTASI INDUSTRI
SURABAYA – JAWA TIMUR

REPORT
Laboratory Test Result

No. : 03 419/KI/II-2014
 Code : Penelitian
 Sample Sender : Risa ITS Surabaya
 Sample Name : Media-Air-Tanah
 Test : Hg
 Sample Brand :
 Sample Identity : Cekam, pasir, reklamasi
 Sample Accepted : 4 Juni 2014

Chemical laboratory test result is :

Kode	Hg, ppm	Kode	Hg, ppm
1. Media-5	1.5 : 2,30	7. AS. 4	1.5 : 2,30
10	2. : 2,41	2	2. : 2,41
15	3. : 2,36	3	3. : 2,36
2. Air Sample	1.10 : 4,78	8. AS. 4	1.10 : 4,78
0.002	2. : 5,02	2	2. : 5,02
3. Tanah	3. : 4,66	9	3. : 4,66
0.004	9. AS. 4	1.15 : 10,81	
4. A1Aul. 5	2. : 9,78	2	2. : 9,78
3. : 3,48	3	3. : 10,22	
3. : 3,51	10. AS. 4	1.5 : 2,56	
5. A1Aul. 10	2. : 2,72	2	2. : 2,72
2. : 6,33	3	3. : 2,60	
3. : 8,90	11. AS. 4	1.10 : 5,70	
5. A1Aul. 15	2. : 5,74	2	2. : 5,74
12,50	3	3. : 5,52	
2. : 11,93	12. AS. 4	1.15 : 10,88	
3. : 12,18	2	2. : 11,54	
	3	3. : 11,36	

Surabaya, 6 Juni 2014
 Chemical Laboratory Researcher

Dni. M. Fatoni, MS

Laboratory office Jl. Ketintang Baru XVII No. 14
 Telp. 031 – 8281943 Bank BCA – Bank Jatim